

Kalle Mäkinen

Teollisen fermentointiprosessin kontaminaatioriskien tunnistaminen ja hallinta

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

5.12.2014

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kalle Mäkinen Teollisen fermentointiprosessin kontaminaatoriskien tunnistaminen ja hallinta 30 sivua + 2 liitettä 5.12.2014
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioprosessien suunnittelu ja käyttö
Ohjaaja	Lehtori Mikko Halsas
<p>Insinööriytyön tavoitteena oli selvittää teollisen fermentointiprosessin kontaminaatoriskejä ja menettelytapoja kontaminaatiolähteen tutkimisessa. Toimeksiantajayrityksen kontaminaatioselvityksen seurauksena työssä tutustuttiin lisäksi fermentoreihin syötettävän prosessi-ilman steriilisuodattimien eheydentestaukseen ja laadittiin suunnitelma steriilisuodattimien käyttöikä tutkimukselle.</p> <p>Työssä keskityttiin erityisesti mekaanisten vikojen aiheuttamiin kontaminaatioihin ja vian löytämisessä hyödynnettävien menetelmien kartoittamiseen. Kontaminaation aiheuttava mekaaninen vika voi olla esimerkiksi prosessi-ilman steriilisuodattimen vaurioituminen, mikä nähtiin käytännössä tämän työn aikana. Kontaminaatoriskien selventämiseksi työssä esitellään pesu- ja sterilointiprosesseja sekä fermenttorin steriilialueen muodostamista.</p> <p>Steriilisuodattimien eheydentestauksessa tutustuttiin Palltronic Flowstar XC -laitteeseen ja Water Intrusion Test -menetelmään. Eheydentestaus todettiin yksinkertaiseksi ja luotettavaksi menetelmäksi varmistaa suodattimien toimintakyky. Eheydentestaukseen perustuvan käyttöikä tutkimuksen suunnitelma laadittiin varmistamaan, että uuden suodatinvalmistajan steriilisuodattimet säilyttävät toimintakykynsä tuotantolaitoksen käyttöolosuhteissa, kun vaihtoväli on valmistajan ilmoittama käyttöikäarvo. Eheydentestauksen antamista virtaama-arvoista tutkitaan myös mahdollisia suodattimien toimintakyvyn muutoksia ja määritetään sopiva tarkastuspiste suodattimien käyttöjakson sisälle. Suunnitelman laatimiseen vaikuttivat huomattavasti käytännön mahdollisuudet eheydentestausten toteuttamiselle.</p> <p>Insinööriytyön tuloksena syntyi tietopaketti, joka voi auttaa tulevaisuuden kontaminaatioselvityksissä ja toimia oppaana yrityksen uusille työntekijöille. Lisäksi työssä käynnistettiin tutkimus, jonka tuloksien avulla yrityksessä voidaan ehkäistä prosessi-ilman steriloinnin epäonnistumisesta aiheutuvia kontaminaatioita.</p>	
Avainsanat	kontaminaatio, sterilointi, eheydentestaus, steriilisuodatin

Author Title Number of Pages Date	Kalle Mäkinen Identification and management of contamination risks in the industrial fermentation process 30 pages + 2 appendices 5 December 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Design and Application of Bioprocesses
Instructor	Mikko Halsas, Lecturer
<p>The purpose of this thesis was to study contamination risks and methods to investigate the source of contamination in the industrial fermentation process. In addition, integrity testing of sterilizing-grade filters was explored and a service life study for fermentor inlet air filters was planned. The service life study was launched following the contamination investigation of the company.</p> <p>The main focus of the contamination risk study was on mechanical failures and on the methods that may be used to find the failure. A mechanical failure could be, for example, a damaged inlet air filter which was observed in practice during this thesis project. The cleaning and sterilization processes and the sterile boundary are presented in the thesis to clarify the contamination risks.</p> <p>Integrity testing of the sterilizing-grade filters was carried out with a Palltronic Flowstar XC integrity test instrument using the Water Intrusion Test. Integrity testing was found a simple and reliable method to ensure that the filters are functional. The service life study was planned to validate that the new filter manufacturer's sterilizing-grade filters retain their functionality in particular conditions when the changing interval is equal to the service life value that the manufacturer has given. The flow values of integrity testing will be also used to evaluate changes in filters and to determine a control point within the period of use. Practical problems to implement the tests had a significant impact on the planning of the service life study.</p> <p>This thesis resulted in an information package which could help contamination investigations in the future and serve as a guide for new employees of the company. Also the service life study was launched and the results will be used to prevent contaminations caused by failures in process air sterilization.</p>	
Keywords	contamination, sterilization, integrity testing, sterilizing-grade filter

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Fermentointiprosessi	1
3	Aseptinen prosessi	2
4	Mikrobikontaminaatio	3
4.1	Vaikutukset	3
4.2	Hallinta	3
5	Kiertopesut	4
6	Sterilointi	6
6.1	Lämpösterilointi	7
6.1.1	Panossterilointi	7
6.1.2	Lämpösteriloinnin kinetiikka	8
6.2	Steriilisuodatus	10
6.3	Steriilisuodattimen sterilointi	12
7	Steriilialue	13
8	Mekaaniset viat	14
8.1	Venttiilit	15
8.2	Tiivisteet	16
8.3	Suodattimet	16
8.4	Putkisto ja liitokset	17
8.5	Lauhteenpoisto	17
9	Kontaminaatiolähteen tutkiminen	18
9.1	Kontaminantin tunnistaminen	18
9.2	Prosessidatan tutkiminen	19
9.3	Prosessilaitteiston tarkastus	19
9.4	Steriiliystesti	19
9.5	Steriilisuodattimien eheydentestaus	20
9.6	Ratkaisun todentaminen	20

10	Roal Oy:n kontaminaatioselvitys	21
11	Steriilisuodattimien käyttöikätkutkimus	21
11.1	Eheydentestauksen toteutus	22
11.1.1	Eheydentestauslaite	24
11.1.2	Water Intrusion Test	25
11.2	Eheydentestaussuunnitelman laatiminen	26
11.3	Tulosten käsittely	28
12	Yhteenveto	29
	Lähteet	31
	Liitteet	
	Liite 1. Eheydentestauksen tulostaulukko	
	Liite 2. Eheydentestauslomake	

1 Johdanto

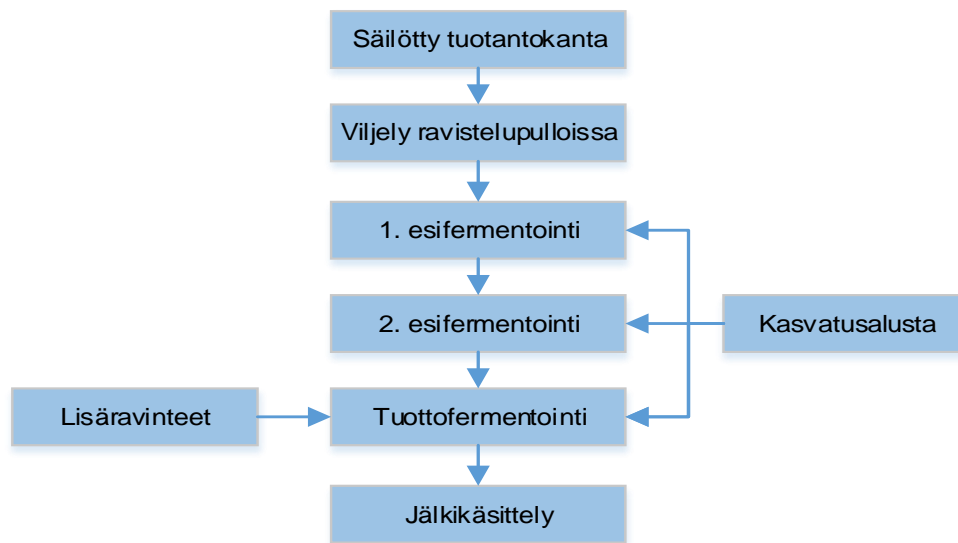
Mikrobikontaminaatioiden estäminen on jokapäiväinen haaste bioteknisiä tuotteita valmistaville yrityksille. Kontaminaatioilla on huomattava taloudellinen vaikutus yritykselle, kun kokonaisia tuotantoeria menetetään, tuotantolinjoja suljetaan selvitystyön ajaksi ja kontaminaatioselvitykset sitovat henkilökuntaa. Tässä työssä selvitetään teollisen fermentointiprosessin kontaminaatoriskejä ja kontaminaatiolähteen tutkimisessa käytettäviä menetelmiä. Kontaminaatoriskien tunnistamisessa keskitytään mekaanisten vikojen aiheuttamiin kontaminaatioihin. Työssä tutustutaan lisäksi laitteiston pesuun, sterilointimenetelmiin ja fermenttorin steriilialueen muodostamiseen, joiden ymmärtäminen on välttämätöntä kontaminaatoriskien tunnistamisessa ja hallinnassa. Työssä käynnistetään myös tutkimus, jonka tavoitteena on lisätä fermenttoreihin syötettävän prosessi-ilman steriilisuodattimien luotettavuutta. Prosessi-ilman steriilisuodatus on yksi kriittinen piste kontaminaatioiden hallinnassa. Tässä osassa tutustutaan steriilisuodattimien eheydentestaukseen ja laaditaan suunnitelma eheydentestaukseen perustuvalla steriilisuodattimien käyttöikä tutkimukselle. Työ käynnistettiin toimeksiantajayrityksen kontaminaatioselvityksen seurauksena.

Työ tehtiin Roal Oy:lle, joka on teollisuusentsyymejä valmistava bioteknologia-alan yritys. Yrityksen tuotantolaitos sijaitsee Nurmijärven kunnassa, Rajamäen kylässä. Roalin teollisen mittakaavan *Trichoderma*-, *Aspergillus*- ja *Bacillus*-fermentoinneista jalostetaan tuotteita elintarvike-, rehu-, tekstiili-, pesuaine- ja metsäteollisuuden erilaisiin käyttösovelluksiin.

2 Fermentointiprosessi

Fermentointiprosessilla tarkoitetaan tuotteiden muodostamista mikro-organismeilla viljelyyn soveltuvissa bioreaktoreissa. Teollisesti tuotettavat yhdisteet voivat olla esimerkiksi aminohappoja, entsyymejä, orgaanisia happoja, vitamiineja tai antibiootteja. Fermentointiprosessilla tuotettavat yhdisteet ovat usein monimutkaisia molekyylejä, joiden valmistaminen synteettisesti olisi mahdotonta tai huomattavan vaikeaa. Tässä tekstissä käsitellään teollisuusentsyymien valmistusta home- ja bakteerifermentoinneilla. Teollisuusentsyymit ovat laajassa mittakaavassa valmistettuja biologisia katalyytte-

jä, joita hyödynnetään eri teollisuudenaloilla. Viljeltävät solut ovat usein geneettisesti muokattuja kantoja, mutta perinteisiäkin kantoja käytetään vielä. Yleensä teolliset tuotantokannat erittävät tuotteen solun ulkopuolelle kasvatusalustaan. Tuottofermentointi voidaan toteuttaa aerobisena panosfermentointina tai panossyöttöfermentointina. Tuottofermentointia edeltää panosfermentointina toteutettu tuotantolinja, jossa solumassan määrää kasvatetaan prosessin tuottovaiheeseen (kuva 1). Panosfermentoinnissa prosessiin ei lisätä merkittäviä määriä aineita. Panossyöttöfermentoinnissa panosvaihetta seuraa syöttövaihe, jossa prosessiin lisätään ravinteita. [1, s. 7–12.]



Kuva 1. Fermentointiprosessin päävaiheet teollisuusentsyymien valmistuksessa.

3 Aseptinen prosessi

Aseptisellä prosessilla tarkoitetaan fermentointiprosessin suojaamista vierailta mikrobeilta. Puhdistettavuus, steriloitavuus ja aseptinen toiminta ovat fermentointiprosessin suunnittelussa tärkein osa-alue. Aseptisessä prosessissa on ehdottoman tärkeää, että kaikki laitteiston osat, jotka voivat olla kosketuksissa prosessiliuoksen kanssa, ovat helposti puhdistettavia ja steriloitavia. Steriloinnin jälkeen prosessia on suojeltava vierailta mikrobeilta koko kasvatuksen ajan, joten aseptinen prosessi on pidettävä eristettynä epäaseptisestä ympäristöstä. Teollisuusentsyymien valmistukselle tyypillinen pitkä kasvatusaika vaikeuttaa prosessin suojaamista ulkopuolisilta mikrobeilta. Aseptisen prosessin onnistuminen edellyttää hyvää prosessisuunnittelua, riittävää validointia,

toimivia menettelyohjeita, huolellisesti suunniteltua kunnossapitoa ja ammattitaitoisia työntekijöitä. [2, s. 61–62.]

4 Mikrobikontaminaatio

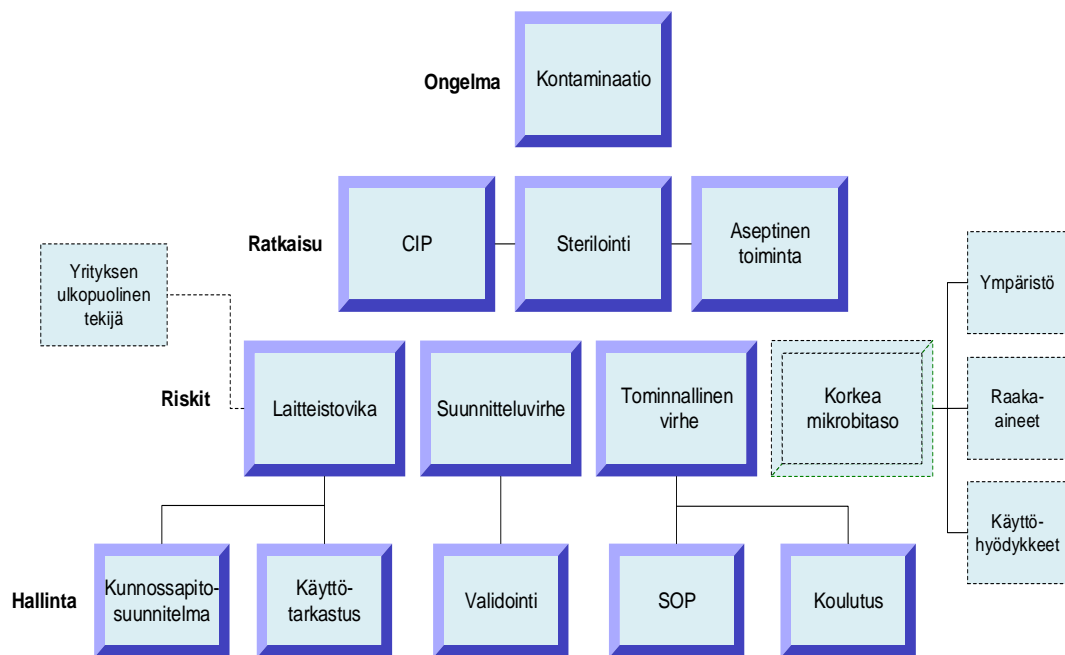
4.1 Vaikutukset

Mikrobikontaminaatio on merkittävin fermentointiprosessin epäonnistumisen aiheuttaja. Mikrobeja esiintyy kaikkialla ympäristössämme ja mikrobien kyky sopeutua ympäristöön mahdollistaa niiden selviytymisen erilaisissa ääriolosuhteissa. Fermentointiprosessissa ilmenevät vieraat mikrobit aiheuttavat puhtasviljelmän kontaminoitumisen, joka voi pahimmillaan johtaa koko kasvatuksen epäonnistumiseen. Kontaminaatio voidaan havaita näyteanalyysien lisäksi esimerkiksi hiilidioksidin tuoton, jäähdytystarpeen ja lisäravinteiden kulutuksen kasvuna. Kontaminaatio saattaa aiheuttaa myös vaahtoaamista ja esimerkiksi hiivakontaminaatio havaitaan helposti hiivalle tyypillisestä hajusta. Jos kontaminaatio havaitaan kasvatuksen alkuvaiheessa, kasvatusta joudutaan yleensä keskeyttämään välittömästi, koska kasvatuksen jatkamisella hukattaisiin vain resursseja. Myöhemmässä vaiheessa kontaminoituneet kasvatukset saattavat tuottaa kohtalaisesti tai vaikutusta ei juurikaan havaita, koska tuotantokanta ja kasvatusolosuhteet voivat estää tehokkaasti kontaminantin kasvua. Jos kontaminaation vaikutus prosessiin ei ole vakava, voidaan kasvatusta jatkaa kontaminaation etenemistä tarkkaillen. Päätös kontaminoituneen kasvatuksen jatkamisesta tehdään kannattavuutta arvioiden. Kontaminantit heikentävät saantoa tuottamalla tuotetta hajottavia tai muuntavia entsyymejä ja kuluttamalla ravinteita. Kontaminantit saattavat myös tuottaa toksineja, jotka vaikuttavat tuotantokantaan tai tuotteen laatuun. Kontaminantin tuottamat yhdisteet voivat lisäksi vaikeuttaa jälkikäsittelyä. [3, s. 1112; 4, s. 251–252.]

4.2 Hallinta

Kontaminaatioiden hallintaan kuuluu kattava riskinarviointi mahdollisille kontaminaatio-riteille. Tuotantolaitoksissa on tyypillisesti useita erilaisia tuotantolinjoja, ja koska fermentointiprosessit poikkeavat toisistaan, arvioidaan myös jokaisen kohteen kontaminaatoriskit erikseen. Kontaminaatoriskien arviointi vaatii paljon tietämystä tuotantoprosessista. Huolellisilla kunnossapitosuunnitelmillä ja päivittäisillä käyttötarkastuksilla

voidaan ehkäistä laitevikojen aiheuttamia kontaminaatioita, kun taas yksityiskohtaiset menettelyohjeet ja operaattorien koulutus auttavat välttämään toiminnallisista virheistä johtuvia kontaminaatioita. Hallintamenetelmät ja kontaminaatoriskien jaottelu nähdään kuvassa 2. Kontaminaatioiden ehkäisemisen lisäksi on tärkeää, että kontaminaatiot havaitaan mahdollisimman nopeasti ja osataan tehdä tarpeelliset toimenpiteet, jotta kontaminaatiosta aiheutuvat menetykset saadaan mahdollisimman pieniksi ja seuraavan kasvatuksen kontaminoituminen estetään. Mahdollisiin kontaminaatioselvityksiin on varauduttava selkeillä suunnitelmilla, jotka auttavat lyhentämään kontaminaatioselvityksistä aiheutuvia tuotantokatkoja. [3, s. 252.]



Kuva 2. Kontaminaatoriskien jaottelu ja menetelmiä riskienhallintaan.

5 Kiertopesut

Kiertopesua eli Clean-In-Place (CIP) -menetelmää käytetään säiliöiden ja putkiston pesuun. Pesun tarkoituksena on poistaa solu-, kasvatusalusta- ja tuotejäämät sekä muut epäpuhtaudet. Pesutulos vaikuttaa merkittävästi steriloinnin onnistumiseen, ja siksi pesut ovat usein automatisoituja prosesseja. Pesulla on estettävä kiintoaineen kerääntyminen ja biofilmien muodostuminen laitteistoon. Biofilmeillä (kuva 3) tarkoitetaan pinnalla kasvavia mikrobipopulaatioita, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa ja ympärilleen muodostamaan polymeeriseen materiaaliin.

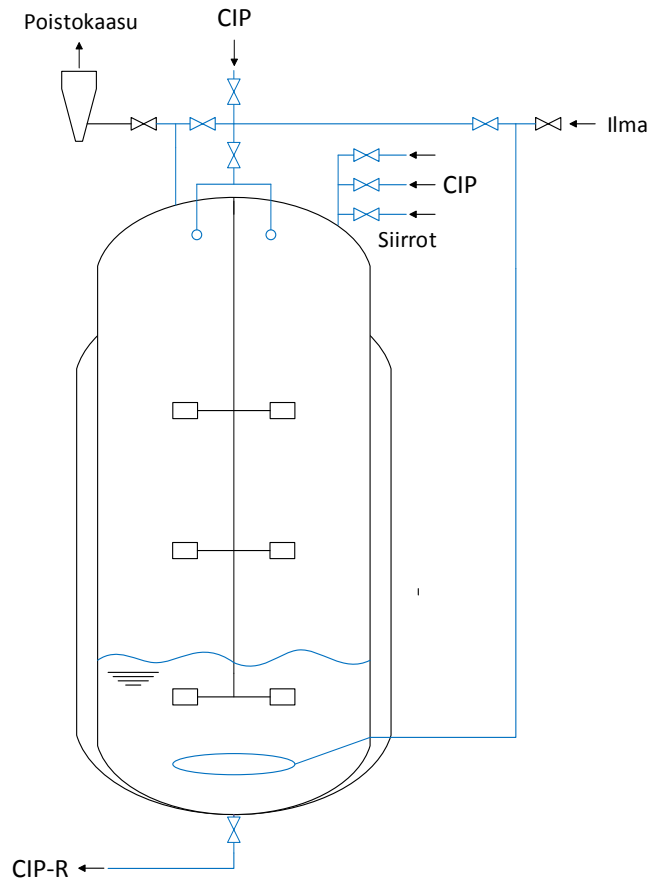


Kuva 3. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin muodostama biofilmi. Gramnegatiiviset sauvat ovat muodostaneet polysakkarideista koostuvan suojakerroksen [5, s. 269].

Pesujen mekaaninen vaikutus saadaan aikaan korkealla virtausnopeudella ja pesupallojen suihkutuksella. Alkuhuuhtelulla poistetaan karkeaa ja vesiliukoista likaa, tämä mahdollistaa pesukemikaalin tehokkaan pääsyn puhdistettavalle pinnalle. Emäksisen pesuliuoksen kierrätyksellä liuotetaan pinnoilta jäljellä oleva lika. Pesukemikaalina käytetään natriumhydroksidia ja pesuliuoksen lämpötila on 75–80 °C. Korkea lämpötila nopeuttaa kemiallisia reaktioita ja mahdollistaa tehokkaan puhdistuksen. Kuumalla jälkuhuuhtelulla poistetaan pesukemikaalijäämät, minkä jälkeen loppuhuuhdelussa pestävä kohde huuhdellaan kuumalla tai kylmällä prosessivedellä.

Pesun onnistuminen edellyttää, että pestävät pinnat ovat mahdollisimman pyöreitä ja sileitä. Suositeltava pinnankarheusarvo (R_a) fermenttorissa on $\leq 0,3 \mu\text{m}$ ja muussa laitteistossa $0,4\text{--}0,5 \mu\text{m}$. Säiliön pesussa pesupallot ohjaavat pesunesteen säiliön yläosaan ja alempana pesuneste valuu seinämiä pitkin säiliön pohjalle. Säiliön pesussa on huomioitava myös sekoittimen ja sekoitushaittojen puhdistuminen. Tyypillisesti pesupallojen tarvitsema tilavuusvirtaus pestävään pinta-alaan nähden on $4\text{--}12 \text{ l/min/m}^2$ ja optimaalinen paine pesupalloille 2–2,5 bar. Perinteisten pesupallojen sijaan voidaan käyttää pyöriviä pesureita. Tukokset tai vauriot pesusuuttimissa heikentävät säiliön puhdistumista ja vaarantavat pesun onnistumisen, minkä lisäksi pesureiden sisään jäänyt lika on potentiaalinen kontaminaatiolähde. Säiliötä voidaan täyttää pesun aikana ensimmäisen sekoitinelementin yläpuolelle, jolloin sekoituksella saadaan lisättyä pesutehoa säiliön alaosaan.

Fermenttorin CIP-pesussa säiliön ja siirtolinjojen lisäksi pestään ilmastus- ja poistokaasulinjat (kuva 4). Ilmastusrenkaan puhdistumisessa ilmenee joskus ongelmia, jos sen sisäosaan on päässyt kerääntymään kiintoainetta. Putkistoissa suositeltava virtausnopeus on 2 m/s. Turbulenttinen virtaus mahdollistaa tehokkaan mekaanisen vaikutuksen ja tasaisen lämmön- ja aineensiirron. [6, s. 201–207.]



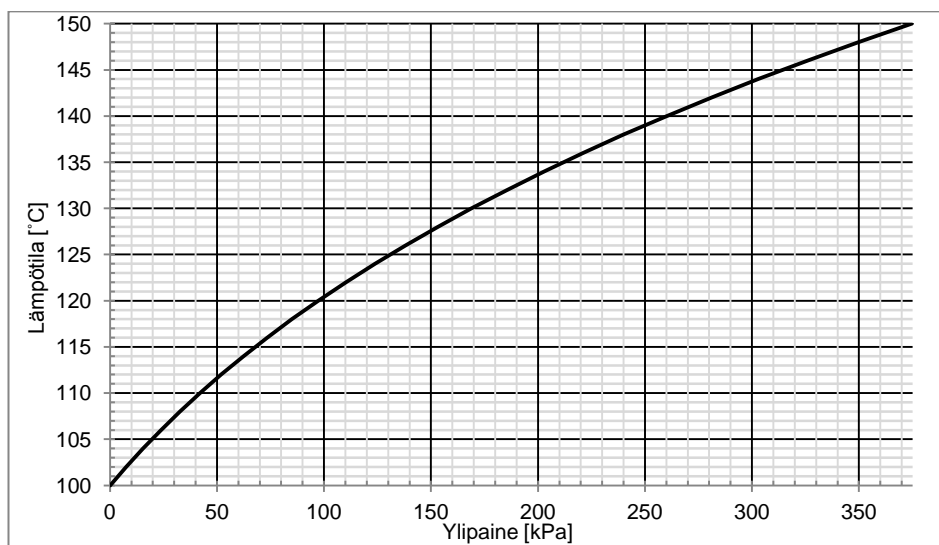
Kuva 4. Esimerkki fermenttorin CIP-pesusta. Sininen väri kuvaa pesunesteen virtausalueita.

6 Sterilointi

Steriloinnilla pyritään tuhoamaan tai poistamaan kohteesta kaikki elinkykyiset solut ja niiden itiöt. Sterilointimenetelmiä ovat lämpösterilointi, steriilisuodatus, kemiallinen sterilointi ja altistaminen ultraviolett-, gamma- tai röntgensäteilylle. Tuotantolaitoksen fermentointiprosessissa käytetään steriilisuodatusta ja lämpösterilointia. Kasvatusalustan, lisäravinteen ja kiinteiden kohteiden sterilointiin käytetään lämpösterilointia. Tiivistevesi, ammoniakkivesi ja ilma steriloidaan suodattamalla. [7, s. 377.]

6.1 Lämpösterilointi

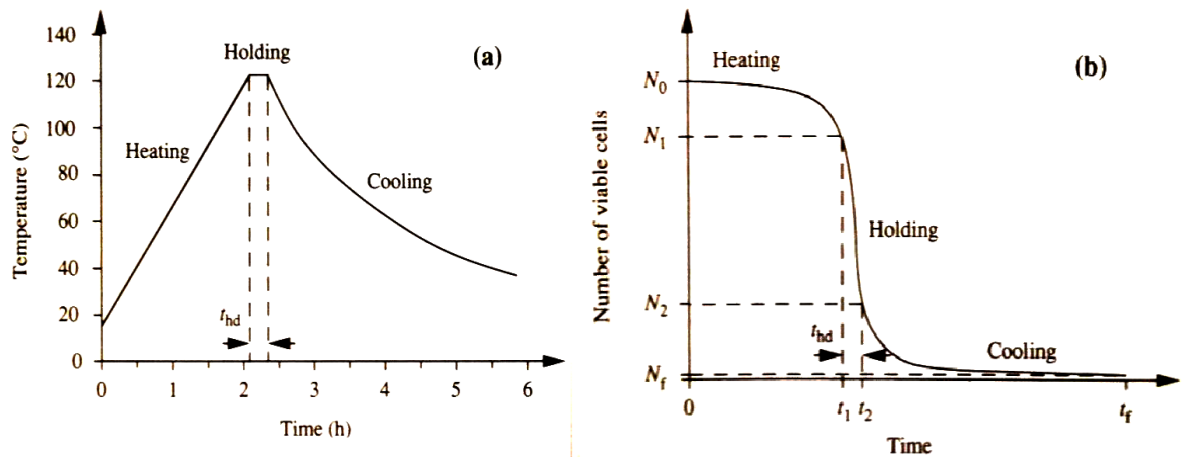
Lämpösterilointi voidaan toteuttaa höyry- tai kuumailmasterilointina. Vegetatiiviset bakteerit sietävät paremmin lämpöä kuivassa ympäristössä, joten höyrysterilointi on huomattavasti tehokkaampi, nopeampi ja taloudellisesti kannattavampi menetelmä. Höyry on kylläistä ja usein suodatettua. Kylläisen höyryn paineen ja lämpötilan välinen riippuvuus nähdään kuvassa 5. Tavallisesti höyrysteriloinnissa lämpötila on 121 °C, mikä riittää tuhoamaan myös bakteeri-itiöt. Teollisessa fermentointiprosessissa höyry on merkittävä kustannustekijä. [2, s. 197–198.]



Kuva 5. Kylläisen höyryn lämpötilan ja paineen välinen riippuvuus.

6.1.1 Panossterilointi

Kasvatusalustat ja lisäravinne steriloidaan panossterilointina fermentoreissa ja erillisissä sterilointisäiliöissä. Panossterilointi toteutetaan syöttämällä höyryä suoraan steriloitavaan liukseen ja säiliön vaippaan. Jäähdytys toteutetaan kierrättämällä jäähdytysvettä vaipan läpi. Kun höyryä syötetään steriloitavaan liukseen, lauhdetta muodostuu tyypillisesti 10–20 % tilavuudesta. Sterilointisykli muodostuu kolmesta vaiheesta: lämmitys, pito ja jäähdytys (kuva 6). [7, s. 377.]



Kuva 6. Panossteriloinnin lämpötilaprofiili (a) ja elinkykyisten solujen väheneminen (b) [7, s. 378].

Steriloinnin mitoituksessa määritetään riittävä pitoaika mikrobien tuhoamiseksi. Suunnittelussa on huomioitava lämpösteriloinnin haitallinen vaikutus kasvatusalustan ravinteisiin. Solujen tuhoutumista tapahtuu myös lämmitys- ja jäähdytysvaiheessa, mikä otetaan huomioon mitoituksessa. Korkea kiintoainepitoisuus heikentää steriloinnin tehoa, koska lämmönsiirto on heikompi partikkeleihin kuin nesteeseen. Teollisuudessa steriloitien mitoituksessa käytetään varmuuskertoimina pidempiä steriloituaikoja ja korkeampia lämpötiloja. [8, s. 200–201.]

6.1.2 Lämpösteriloinnin kinetiikka

Empiiristen havaintojen perusteella on laadittu joitakin steriloinnin mitoituksessa hyödynnettäviä laskukaavoja. Yksinkertaisin on vegetatiivisten solujen ja itiöiden tuhoutumista kuvaava ensimmäisen kertaluvun yhtälö:

$$\frac{dN}{dt} = -k_d N \quad (1)$$

k_d on spesifinen kuolemisvakio

N on elinkykyisten solujen tai itiöiden määrä

t on aika

Kuolemisvakio on riippuvainen mikrobilajista ja sen fysiologisesta muodosta. Spesifisen kuolemisvakion riippuvuus lämpötilasta noudattaa Arrheniuksen yhtälöä:

$$k_d = Ae^{\left(-\frac{E_d}{RT}\right)} \quad (2)$$

A on Arrheniuksen vakio eli taajuustekijä

E_d on aktivoitumisenergia

R on kaasuvakio

T on lämpötila

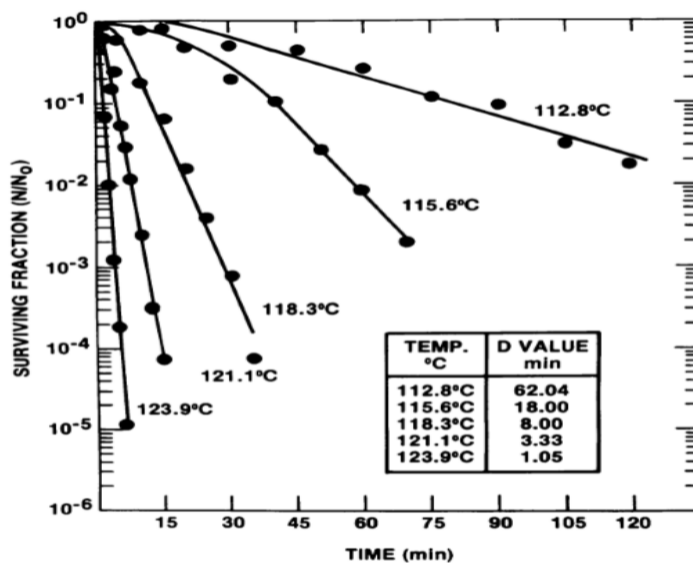
Lämpötilan vaikutus kuolemisvakioon korostuu mikrobeilla, joiden aktivoitumisenergia on suuri. Eksponentiaalista tuhoutumista steriloinnin eri vaiheissa (kuva 6) voidaan kuvata seuraavalla yhtälöllä:

$$\ln \frac{N}{N_0} = - \int_0^t Ae^{\left(-\frac{E_d}{RT}\right)} dt \quad (3)$$

D-arvo (4) on mikrobikohtainen aika, joka tarvitaan tuhoamaan 90 % elinkykyisistä soluista tai itiöistä tietyssä lämpötilassa.

$$D = \frac{2,303}{k_d}, \quad \frac{N}{N_0} = 0,1 = e^{-k_d D} \quad (4)$$

Sterilointitutkimuksissa ja -mitoituksessa käytetään yleensä referenssinä *Bacillus stearothermophilus* -bakteerin itiöitä. Kuvasta 7 nähdään, kuinka paljon muutaman asteen lämpötilamuutos vaikuttaa *Bacillus stearothermophilus* -itiöiden D-arvoon.



Kuva 7. *Bacillus stearothermophilus* 12980 -itiöiden tuhoutuminen eri lämpötiloissa [10, s. 366].

Mikrobikohtaisella z-arvolla (5) ilmaistaan lämpötilamuutos, joka muuttaa D-arvoa dekadilla.

$$Z = \frac{\Delta T}{\Delta(\log_{10} D)} \quad (5)$$

Yleisesti sterilointilaskuissa käytetty z-arvo on 10 °C, mikä on *Bacillus stearothermophilus* -itiöiden z-arvo höyrysteriloinnissa. F-arvo (6) kuvaa steriloinnin kokonaisvaikutusta ottaen huomioon lämmitys- ja jäähdytysvaiheet. F-arvo ilmaisee ajan vertailulämpötilassa, joka vastaa sterilointikäsitteilyn vaikutusta.

$$F = \int_0^t 10^{\frac{T-T_R}{Z}} dt \quad (6)$$

T_R on vertailulämpötila, jonka D-arvo tiedetään

Steriloinnin mitoituksessa lämpökäsittelyn tekemää työtä voidaan kuvata ∇ -arvolla (7). ∇ -arvon käyttö on yleistä sterilointianalyseissä, kun halutaan eritellä sterilointivaiheet. Tarvittava pitoaika määritetään laskemalla lämmitys- ja jäähdytysvaiheiden tekemä työ.

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N} = A \int_0^t e^{\left(-\frac{E_d}{RT}\right)} dt \quad (7)$$

$$\nabla_{\text{Total}} = \nabla_{\text{Heating}} + \nabla_{\text{Holding}} + \nabla_{\text{Cooling}} \quad (8)$$

[2, s.198–199; 4, s. 1113; 9, s. 1616–1617.]

6.2 Steriilisuodatus

Steriilisuodatuksen tavoitteena on poistaa solut ja niiden itiöt käsiteltävästä nesteestä tai kaasusta. Steriilisuodatus soveltuu erityisesti ilman ja muiden kaasujen sterilointiin. Steriilisuodatusta käytetään myös alhaisessa lämpötilassa kaasuuntuvien ja termolabii-lien nesteiden sterilointiin. Aerobiseen fermentointiprosessiin syötettävän ilman lämpösterilointi ei olisi teknisesti ja taloudellisesti järkevää. Ilmastussuhde aerobisessa fermentointiprosessissa on tyypillisesti 0,5–1,0 vvm. Ilmastussuhteella tarkoitetaan syöttöilman tilavuutta normaalikuutiometreinä minuutissa jaettuna prosessiliuoksen tilavuudella.

Steriilisuodattimet koostuvat suodatinkotelosta ja vaihdettavista suodatinpatruunoista. Suodatuspinta-alan on oltava suuri, koska tarvittava virtaus on saavutettava mahdollisimman pienellä painehäviöllä. Steriilisuodatuksen yhteydessä käytetään esisuodattimia, joiden tarkoituksena on poistaa suuremmat partikkelit. Esisuodattimet pidentävät huomattavasti steriilisuodattimien käyttöikää.

Suodattimen toimintaperiaatteet voidaan jakaa syvä- ja pintasuodatukseseen. Pintasuodatuksessa huokoskokoa suuremmat mikrobit ja muut partikkelit kerääntyvät kalvon pinnalle. Pintasuodatus on ns. absoluuttinen suodatus, jossa kalvon huokoskokoa suuremmat partikkelit eivät yksinkertaisesti mahdu huokosten läpi. Syväsuodatuksessa partikkelit jäävät kuitukerroksista koostuvan matriisin eri syvyyksiin fysikaalisten vaikutusten, elektrostaattisten vuorovaikutusten ja diffuusion avulla. [7, s. 386; 8, s. 208.]

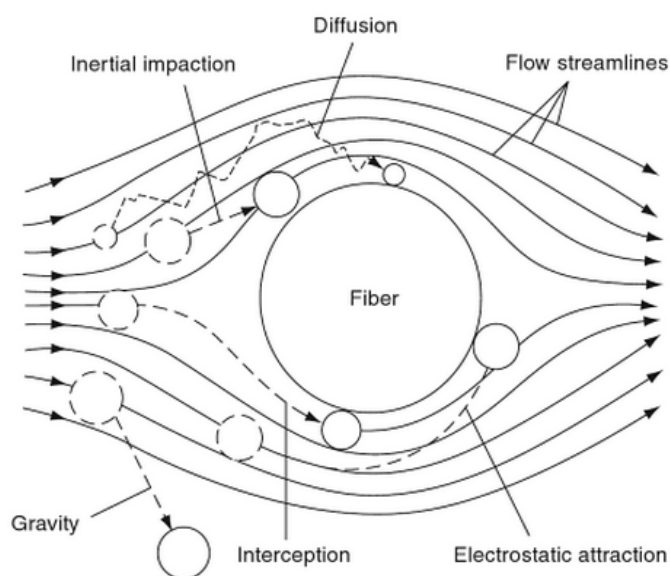
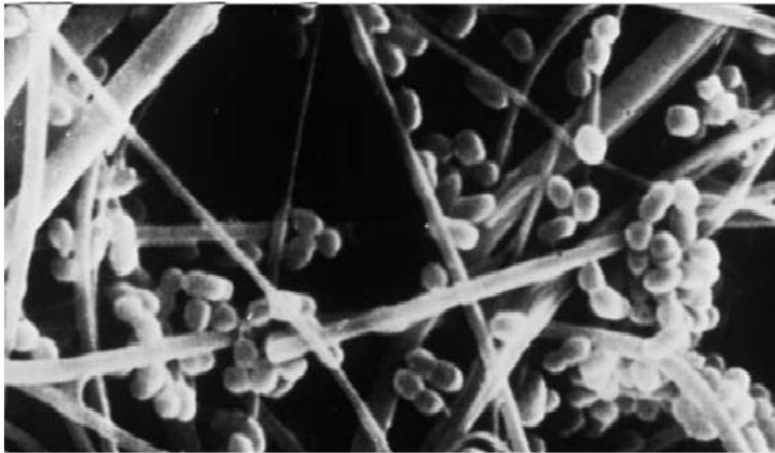


Figure 2.1. Mechanisms of particle capture.

Kuva 8. Syväsuodatuksen suodatusmekanismit. Suodatusmekanismien tehokkuus on riippuvainen partikkelin koosta [11, s. 30].

Diffuusio perustuu Brownin liikkeeseen. Brownin liikettä esiintyy vain pienillä, alle 0,5 mikrometrin partikkeleilla. Brownin liike lisää mahdollisuutta, että pienet hiukkaset törmäävät suodattimeen. Inertiaalisessa törmäyksessä partikkelin hitaus on niin suuri, ettei se kykene äkilliseen suunnanmuutokseen ja törmää suodatinmateriaaliin. Hitaus tarkoittaa kappaleen taipumusta vastustaa liiketilän muutoksia. Sieppauksessa partikkeli tarttuu suodatinmateriaaliin ajautuessaan tarpeeksi lähelle. Sieppaus voi tapahtua,

kun partikkelin massakeskipisteen etäisyys suodatinmateriaalista on enintään partikkelin säde. [11, s. 30.]



Kuva 9. Elektronimikroskooppikuva syväsuodattimen kuitumatriisiin jääneistä *Brevundimonas diminuta* 19146 -soluista [12, s. 39].

Steriilisuodattimien materiaalit ovat usein polytetrafluorieteeni (PTFE) ja polypropeeni. Suodattimien kalvo on PTFE:tä ja tukimateriaali polypropeenaa. PTFE:stä valmistetut steriilisuodattimet ovat lämpösteriloitavia. Ilmansuodattimien materiaalit ovat hydrofobisia, kun taas nestesuodattimissa käytetään hydrofiilisiä materiaaleja. Steriilisuodattimet ovat absoluuttisia suodattimia, joiden huokoskoko on yleensä 0,2 mikronia. Ilmasta steriilisuodattimet poistavat huomattavasti pienempiä partikkeleita. Tuotantolaitoksella käytetään esisuodattimia, joiden nimellinen suodatusaste on ilmansuodattimissa 1,0 mikronia ja nestesuodattimissa 1,5 mikronia.

6.3 Steriilisuodattimen sterilointi

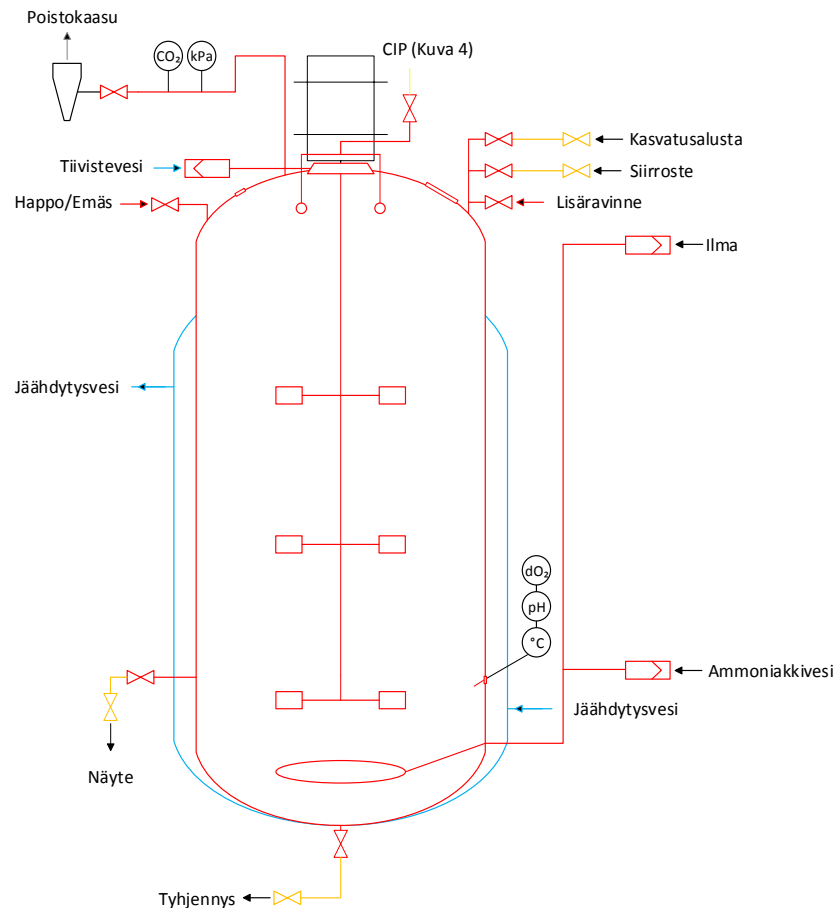
Ilmansuodattimet voidaan steriloida syöttämällä höyryä samaan tai vastakkaiseen suuntaan virtauksen kanssa, mutta nestesuodattimet steriloidaan aina virtaussuuntaan. Ilmansuodattimet steriloidaan tyypillisesti säiliön ja putkiston steriloinnin yhteydessä. Nestesuodattimet steriloidaan säännöllisesti suodattimen pinnalle kerääntyvien mikrobin tuhoamiseksi. Steriilisuodattimien sterilointi on välttämätöntä, mutta sterilointi voi vaurioittaa suodattimia, koska polymeerikomponentit tulevat joustaviksi korkeassa lämpötilassa, jolloin suodattimen rakenne saattaa muotoutua paine-eron vaikutuksesta. Tämän takia steriloinnissa on tarkkailtava, että paine-ero ei kasva liian suureksi. Yli yhden baarin paine-ero virtaussuuntaan tai yli 0,5 baarin paine-ero vastakkaisuuntaan

voi johtaa suodattimen vaurioitumiseen. Lauhteen on poistuttava tehokkaasti suodattimesta riittävän sterilointivaikutuksen saavuttamiseksi. Lisäksi paine-ero nousee välittömästi, jos suodatin on märkä. Vasta kun suodattimen pinnalle kerääntynyt lauhde on höyrystynyt kokonaan, höyry pääsee taas virtaamaan vapaasti suodattimen läpi. Höyryventtiilien avaaminen ei saa aiheuttaa suodattimeen voimakasta paineiskua, joka voisi vaurioittaa suodattimen rakennetta. [13, s. 6–10.]

7 Steriilialue

Kontaminaatiot voidaan jakaa karkeasti kahteen osaan: steriloinnin epäonnistumiseen ja epäonnistumiseen steriiliyden säilyttämisessä. Kontaminaatioiden välttämiseksi on tärkeää ymmärtää steriilialueen käsite. On myös osattava ennakoida, miten steriiliys voi muuttua erilaisissa tilanteissa. Esimerkiksi säiliön ylipaine voi ylläpitää steriiliyttä tehokkaasti, mutta paineen tasaantuessa tai vakuumialueen muodostuessa edes hetkellisesti, steriiliyden ylläpito vaarantuu välittömästi. Prosessitietämyksen lisäksi on tunnistettava steriilialueen ja ympäristön mikrobiologiset haasteet ja niiden vaikutukset. [14, s. 4.]

Putkisto on steriloitava aina steriilialueen ja ympäristön erottavan venttiilin yli. Steriilialue voidaan eristää ympäristöstä myös steriilisuodattimella. Steriilialueen rajan muodostavat putkistovenktiilien ja steriilisuodattimien lisäksi säiliön seinämä, sekoitinakselin läpivienti, miesluukut, näkölasit, lauhteenpoistot, poistokaasulinja, näytteenottolinja ja mittausanturit (kuva 10). Vaikeasti puhdistuvat anturit irrotetaan ja puhdistetaan ennen sterilointia. Steriloinnissa on ehdottoman tärkeää kaikkien steriloitavan laitteiston osien lämpeneminen haluttuun lämpötilaan riittäväksi ajaksi. Lauhteenpoistajien on toimittava tehokkaasti ja ilma on syrjäytettävä kylläisellä höyryllä, koska ilma estää höyryn pääsyn kaikille alueille ja heikentää lämmönsiirtoa. Höyrysulkuja käytetään steriilialueen eristävien venttiilien takana. Höyrysulut ovat varotoimi, jolla voidaan estää tiiviiden menettämisestä aiheutuvia kontaminaatioita. Siirrot säiliöstä toiseen suoritetaan käyttämällä steriiliä ilmaa syöttösäiliön paineistamiseen. Siirtolinjoissa on aina jatkuva höyrytys ennen siirtoa. [4, s. 257.]



Kuva 10. Yksinkertainen kuvaus fermenttorin steriilialueen rajoista. Punainen kuvaa steriilialuetta ja keltainen höyrysulkuja.

8 Mekaaniset viat

Syyt kontaminaatioon voidaan jakaa suunnitteluvirheisiin, laitevikoihin ja toiminnallisiin virheisiin. Pitkään toimineilla tuotantolaitoksilla yleisin syy kontaminaatiolle on mekaaniset viat. Säännöllisesti tarkastettu ja huollettu laitteisto on tehokkain tapa ehkäistä mekaanisten vikojen aiheuttamia kontaminaatioita. Fermenttoriin liittyvien osien on oltava ennen kaikkea hyvin tiivistettyjä, koska vuodot mahdollistavat kontaminantin pääsyn prosessiin. Mikrobit voivat läpäistä steriilialueen rajan kulkeutumalla nesteen tai ilman mukana prosessiliuokseen. On myös mahdollista, että mikrobit tunkeutuvat vuotokohdan läpi jakaantumalla nopeasti. Vuotojen aiheuttamia kontaminaatioita ehkäistään pitämällä säiliö koko ajan paineistettuna steriloinnin jälkeen. Yleisesti pidetään epätodennäköisenä, että ilmavirtauksen mukana ympäristön mikrobit päätyisivät vuotokohdasta paineistettuun säiliöön, jos nestekanavaa ei ole olemassa. Mahdollisten vuotokohtien säännöllisellä tarkastamisella vuodot voidaan havaita ajoissa. Yksinkertaisin

tapa on prosessilaitteiston visuaalinen tarkastus. Vuotoja voidaan myös etsiä erilaisilla painetesteillä, joissa esimerkiksi mitataan paineenalennemaa tai paineistetaan kohde värillisellä kaasulla. Lämpötila- ja painemittauksien seuranta on myös tärkeä osa kontaminaatioiden estämisessä, joten mittausanturien toiminnan on oltava luotettavaa. Lämpötilamittauksilla varmistetaan myös prosessin kylmien kohtien lämpeneminen sterilointilämpötilaan. [4, s. 252–255; 14, s. 5.]

8.1 Venttiilit

Steriilialueen automaattiventtiilit ovat pääasiassa kalvoventtiileitä. Kalvomateriaalin on kestävä korkeita lämpötiloja ja kemiallista rasitusta. Kalvoventtiilit soveltuvat hyvin aseptiseen prosessiin ja kiintoainetta sisältäville fluideille. Venttiilikalvon käyttökään vaikuttaa lämpötilan, virtauksen ja paine-eron aiheuttama rasitus.



Kuva 11. Höyryn vaurioittama venttiilikalvo. Kalvoventtiilin hörypuoli on turvonnut ja palkeenkielillä.

Kalvoventtiilien perushuoltoon kuuluu kalvojen säännöllinen vaihto. Steriilialueen vaikeissa kohdissa, esimerkiksi pohjaventtiilinä, voidaan käyttää höyrysuojauksella varustettuja venttiileitä. Steriilialueen käsiventtiileinä käytetään palloventtiileitä, jotka soveltuvat myös hyvin lämpimiin olosuhteisiin. Palloventtiilit ovat luotettavia sulkuventtiileitä, mutta niiden puhdistuvuudessa on heikkouksia. Palloventtiileitä käytetään lähinnä kemikaali-, höyry- ja lauhdelinjoissa. Viallinen venttiili voi vuotaa ulkoisesti rungosta tai sisäisesti sulkuelimestä. [15, s. 11–12.]

8.2 Tiivisteet

Tiivisteiden tarkoitus on muodostaa täydellinen tiiviys kahden pinnan välille. Tiivistemateriaalien on oltava lämmön- ja höyrykestäviä. Fermentointiprosessiin soveltuvat tiivistemateriaalit ovat Teflon, Viton, EPDM ja silikonit. Teflonilla on erinomainen lämmön-sietokyky, mutta se ei veny ja on plastisesti muotoutuva jatkuvassa lämpökuormituksessa. Vitonin paras puoli on kemikaalikestävyys, mutta se kovettuu käytössä. Lisäksi on syytä pitää mielessä, että kaikki Vitonit eivät kestä höyryä ja pesukemikaaleja. Tiivisteiden tulee olla helposti vaihdettavissa ja ylläpitää tiiviyttä vaativissakin olosuhteissa. Tiivistemateriaali valitaan aina käyttöolosuhteisiin soveltuvaksi. O-renkaat ja muut tiivisteet ovat kriittisiä pisteitä steriilialueen rajalla, koska niiden takana ei ole yleensä suojausta vuodon varalle. Halkeamat ja muut vauriot tiivisteissä aiheuttavat vuoto- ja puhdistumisriskin. Etenkin pH- ja dO₂-anturien O-renkaat on järkevää vaihtaa usein. [15, s. 119; 14, s. 3.]

Sekoitinakselin läpiviennin tiivistykseen käytetään mekaanisia akselitiivisteitä. Sekoitinakselin mekaaniset liukurengastiivisteet ovat kalliita ja työläitä vaihtaa, ja siksi niiden käyttöikä on syytä arvioida kontaminaatio-ongelmien välttämiseksi. Viallinen akselitiiviste voi aiheuttaa kiintoaineen kerääntymistä tai tiivisteveden vuotamista säiliöön.

8.3 Suodattimet

Suodattimien ongelmat voivat johtua suodatinpatruunojen vaurioitumisesta tai virheellisestä asennuksesta. Steriili-ilmansuodattimien muotoutuminen ja huokosten laajentuminen johtavat toimintakyvyn pettämiseen. Steriloinneista johtuvat toistuvat lämpötilavaihtelut vaikuttavat suodatinmateriaalien rakenteen muotoutumiseen, kun materiaalit tulevat joustavimmiksi steriloinnissa ja pehmenevät ajan kuluessa. Lisäksi lämpötilavaihtelu vaikuttaa tiivisteiden kulumiseen. Toistuvat steriloinnit voivat aiheuttaa myös ilmansuodattimen hydrofobisuuden heikkenemistä, mikä lisää kosteuden aiheuttamia ongelmia. Kosteus ilmajärjestelmässä altistaa steriili-ilmansuodattimet vaurioitumiselle, koska vesipisaroiden törmäys ja veden kerääntyminen kalvoksi ilmansuodattimen pinnalle voivat rikkoa suodattimen. Suodattimen pinnalle kerääntyvä neste lisää painehäviötä ja paine-eron suureneminen lisää suodattimen vaurioitumisriskiä. Vedenerotuksella varustetuilla jälkijäähdyttimillä vähennetään merkittävästi järjestelmään kulkeutuvan veden määrää. Kosteus aiheuttaa myös korroosiota järjestelmään, jolloin putkistos-

ta irtoava ruoste ja putkihilse voivat vaurioittaa suodattimia. Kosteuden lisäksi kompressoidun ilman mikrobitason tulisi olla mahdollisimman alhainen. Kosteuden tiivistyminen laitteistoon ja mikrobien kasvulle edullinen lämpötila mahdollistavat mikrobien kasvun järjestelmän sisällä. Korkea mikrobitaso lisää mikrobien kerääntymistä suodattimiin ja heikentää suodattimien toimintaa. Myös öljyn kulkeutuminen järjestelmään nesteinä tai aerosolina voi aiheuttaa vaurioita. Vesihöyryn ja öljyn reagoiminen tuottaa happamia yhdisteitä. Öljyn aiheuttamia ongelmia voidaan välttää käyttämällä öljyttömiä kompressoreita. [7, s. 386; 16, s. 1.]

8.4 Putkisto ja liitokset

Liitosten määrä fermenttorissa pidetään mahdollisimman pienenä. Paras liitosvaihtoehto aseptisessä prosessissa on hitsaussauma. Jos hitsaus ei ole mahdollinen vaihtoehto, yleinen ratkaisu on laippaliitos. Liitoksiin ei saa kerääntyä kiintoainetta. Putkistokaltevuuksien on estettävä ruuhkakohtien muodostuminen ja kaltevuuden on oltava erityisen jyrkkä, jos höyryn virtaussuunta on vastakkainen lauhteiden valumissuuntaan nähdessä. Putkistosuunnittelussa on vältettävä putkiston päähän tai haaraan muodostuvia yksisuuntaisia kohtia, jotka puhdistuvat huonosti ja ovat mahdollisia vakuumialueita. Prosessilaitteiston rappeutuminen iän myötä voi tuoda mukanaan steriiliysongelmia, kun jatkuvat lämpötilavaihtelut heikentävät liitoksia ja aiheuttavat vaurioita. Vanhoissa fermentoreissa tulpatut yhteet ovat yleisiä, mutta jos yhteet eivät ole käytössä, kierrettävät tulpat on järkevää poistaa ja hitsata yhteet umpeen. Jos yhteitä tarvitaan mahdollisesti tulevaisuudessa, on suositeltavaa puhdistaa tai vaihtaa tulpat säännöllisesti. [14, s. 2–5.]

8.5 Lauhteenpoisto

Lauhdetta muodostuu kaikissa höyrysteriloinnin vaiheissa. Lauhteen on valuttava nopeasti kohtaan, johon lauhteenpoisto on sijoitettu. Lauhteenpoistolinjoissa voidaan käyttää manuaalisesti säädettäviä tai automaattisia lauhteenpoistoveniileitä. Lauhteiden valuma-alueet ovat mahdollisia kylmiä kohtia prosessissa. Lauhteenpoistojen toiminta ja lämpötila tarkastetaan jokaisen steriloinnin yhteydessä ja kriittisimmät lauhteenpoistot on tarkastettava mahdollisimman usein tai niihin on lisättävä lämpötilamittaus ja hälytys. Lämmönsiirto-ongelmien lisäksi viallinen lauhteenpoisto voi aiheuttaa

vaurioita laitteistoon ja steriilisuodattimien yhteydessä lauhteenpoiston toimintaan on kiinnitettävä erityistä huomiota.

9 Kontaminaatiolähteen tutkiminen

Kontaminaatiolähteen selvittäminen voi olla todella haastavaa, mutta kontaminaatiotapauksista löytyy usein yhtäläisyyksiä, joten yleisen tutkimusstrategian muodostaminen on mahdollista. Selkeillä kirjallisilla ohjeilla ja tarkastuslomakkeilla helpotetaan ja nopeutetaan huomattavasti kontaminaatioselvitystä. Ensimmäisenä kannattaa selvittää, onko poikkeavia tapahtumia havaittu, ja yleinen käytäntö on, että ne kirjataan muistiin. Kirjattujen tapahtumien läpikäynnin lisäksi voidaan havaintoja tiedustella kyselemällä. Tämä kannattaa tehdä mahdollisimman nopeasti, kun tapahtumat ovat vielä tuoreessa muistissa, ongelmana tosin on se, että kun kontaminaatio havaitaan, siihen johtaneista tapahtumista on kulunut yleensä jo useita päiviä. Kontaminaatioselvityksessä mitään asiaa ei kannata jättää tutkimatta sen takia, että toiminta on ollut aina ennen luotettavaa.

9.1 Kontaminantin tunnistaminen

Kontaminaation aiheuttaneen mikrobin tunnistaminen voi auttaa vianetsinnässä. Gramvärjäys ja morfologinen tarkastelu antavat nopeasti tietoa, jonka avulla voidaan onnistua kohdistamaan tutkimus oikeaan suuntaan. Joitakin yleisiä yhtäläisyyksiä kontaminaatiolähteen ja kontaminanttityypin välillä on havaittu. Gramnegatiiviset bakteerit voivat ilmentää jäähdytysvesivuotoa tai kosteutta syöttöilmassa, kun taas grampositiiviset, itiöivät bakteerit ilmentävät mahdollisesti riittämättömästä pesusta tai kasvatusalustan suurista partikkeleista aiheutuneesta alisteriloitumisesta. Hiivat ja homeet yhdistetään usein ilmaan. Kun tutkimus kohdistetaan tietylle alueelle, voidaan alueelta ottaa mikrobiviljelynäytteitä, joita verrataan kontaminanttiin. Kontaminanttien geneettisellä tyyppityksellä yritys voi luoda oman kontaminanttikirjaston, jolloin toistuvat tapaukset voidaan tunnistaa nopeasti. [4, s. 265.]

9.2 Prosessidatan tutkiminen

Prosessidatan tutkimisen tarkoituksena on löytää poikkeavia havaintoja prosessihistoriasta ja kirjatusta parametreista. Prosessidatasta voidaan tarkastaa muun muassa kasvatusparametrien kuvaajat, sterilointilämpötilat, venttiilien asennot, painemittaukset ja prosessihälytykset. Eräkohtaisista päiväkirjoista voidaan etsiä huomautuksia poikkeavista tapahtumista. Edellisen kasvatuksen tiedot on myös hyvä tarkastaa.

9.3 Prosessilaitteiston tarkastus

Huoltohistorian tutkiminen voi auttaa kontaminaatiolähteen löytämisessä. Viimeisimmillä huolloilla tai prosessimuutoksilla saattaa olla yhteys kontaminaatioon. Prosessilaitteiston tarkastus kannattaa aloittaa välittömästi. Yksinkertaisia toimenpiteitä ovat mittausanturien puhdistus ja tiivisteiden vaihto, lauhteenpoistajien tarkastus ja visuaalinen ulkoisten vuotojen etsiminen. Ulkoisia vuotoja voidaan etsiä ainakin putkistosta, venttiileistä, näkölaseista, miesluukuista, tulpatuista yhteistä, laippaliitoksista ja hitsausaumoista. Lisäksi tarkastetaan, että kaikki venttiilit ja takaiskut toimivat oikein. Etenkin säiliön pohjaventtiiliin kohdistuu paljon rasitusta, joten sen kunto on syytä tarkastaa. Jos kontaminaatiolähdettä ei ulkoisen tarkastuksen jälkeen ole paikannettu, siirrytään prosessilaitteiston sisäiseen tarkastukseen. Säiliön sisältä tarkastetaan kaikki pinnat, sekoitin ja ilmastusrengas. Erityisesti kiinnitetään huomiota vuotoihin ja kiintoaineen kerääntymiseen. Mahdollinen vaipan vuoto voidaan havaita täyttämällä säiliö vedellä ja paineistamalla vaippa ilmalla. [14, s. 8.]

9.4 Steriiliystesti

Steriiliystesti eli Media Hold -testi on menetelmä, jossa suoritetaan testiajo ilman tuotantokantaa. Kasvatusalusta sisältää tarvittavat ravinteet kontaminantin havaitsemiseen. Kasvatusolosuhteet luodaan edulliseksi nopealle kasvulle. Testialusta voidaan valmistaa esimerkiksi lisäämällä veteen glukoosia $0,125 \text{ kg/m}^3$, hiivauutetta $0,25 \text{ kg/m}^3$ ja vaahdonestoainetta. Testissä lämpötila pidetään 35 °C :ssa ja pH neutraalina. Sopiva testiaika steriiliystestille on seitsemän päivää. Steriiliystestillä ei voida tutkia mahdollista kasvatusalustan alisteriloitumista, koska testialustan ominaisuudet poikkeavat huomattavasti tavallisesta kasvatusalustasta. Steriiliystestissä pesu- ja sterilointiprosessit suo-

ritetaan normaalilla tavalla. Testistrategia luodaan asetettujen hypoteesien perusteella, jolloin voidaan poistaa osia tutkimuksesta ja päästä todellisen kontaminaatiolähteen jäljille. Steriiliystesti on hyvä suorittaa aina, jos kontaminaatio toistuu peräkkäisissä kasvatuksissa, eikä kontaminaatiolähde ole selvillä. [4, s. 258.]

9.5 Steriilisuodattimien eheydentestaus

Suodattimien toiminnan varmistamiseksi voidaan tehdä erilaisia eheystestejä. Teollisessa mittakaavassa käytetään automatisoituja eheydentestauslaitteita, jotka ovat helppokäyttöisiä ja sisältävät useita erilaisia testimenetelmiä. Teollisuudessa suodattimien pinta-ala on suuri, joten suodattimia testataan lähinnä Forward Flow - tai Water Intrusion -menetelmillä. Nestesuodatuksessa hydrofiilisille suodatinmateriaaleille soveltuu Forward Flow -menetelmä, joka perustuu diffuusiovirtaukseen vedellä kostutetun suodattimen läpi. Menetelmä soveltuu myös hydrofobisille suodatinmateriaaleille, mutta suodatin on kastettava veden ja etanolin tai isopropanolin seoksella, koska vesi ei pääse hydrofobisen suodattimen huokosiin. Yleensä hydrofobisten suodattimien testaukseen käytetään kuitenkin Water Intrusion -menetelmää. Menetelmillä saadut tulokset korreloivat Bacterial Challenge -testin tulosten kanssa. Bacterial Challenge -testiä käytetään suodattimien validointiin. Menetelmässä mitataan mikrobien kykyä tunkeutua suodattimen läpi, kun kuormitus on vähintään 10^7 *Brevundimonas diminuta* -solua per neliösenttimetri suodatuspinta-alaa. Testin *B. diminuta* -solujen koko on 0,3 x 0,6–0,8 mikrometriä. [17, s. 10; 18, s. 143, 147.]

9.6 Ratkaisun todentaminen

Usein teollisuudessa tuotantoaikataulu estää jokaisen kontaminaatiotapauksen perusteellisen tutkimuksen. Kontaminaation esiintyessä suoritetaan yksinkertaiset kunnossapitotoimenpiteet ja seuraavassa erässä varmistetaan pesun ja steriloinnin riittävyys. Jos laitteistossa havaitaan tiukasti kiinnittynyttä likaa, voidaan fermenttori täyttää kuumalla natriumhydroksidiliuoksella ja sekoittamalla liuottaa säiliö puhtaaksi. Jos kontaminantti on itiöivä bakteeri, voidaan suorittaa tavallista voimakkaampi fermenttorin tyhjästerilointi. Laajempi kontaminaatioselvitys on järkevää käynnistää, jos kontaminaatio toistuu tai useat kasvatukset ovat kontaminoituneet. Kun todennäköinen kontaminaatiolähde on löytynyt, korjaustoimenpiteitä seuraa ratkaisun todentaminen. Löydetyn kon-

taminaatiolähteen lisäksi saattaa olla muitakin kontaminaation aiheuttavia tekijöitä. Steriiliystestillä voidaan varmistaa tuotantolinjan turvallinen käyttöönotto. Laajan kontaminaatioselvityksen jälkeen on suositeltavaa toistaa puhdas steriiliystesti, etenkin jos aiempien kontaminoituneiden steriiliytestien välissä on esiintynyt puhtaita testejä. Selvityksessä syntynyt aineisto dokumentoidaan tueksi seuraaville kontaminaatiotutkimuksille.

10 Roal Oy:n kontaminaatioselvitys

Roal Oy:n tuotantolaitoksella tehtiin laaja kontaminaatioselvitys, jonka tuloksena havaittiin ongelmia yhden tuotantofermenttorin sekoitinakselin läpiviennin tiiviydessä ja fermenttoreihin syötettävän prosessi-ilman steriilisuodattimissa. Selvityksen aikana todettiin, että valmistajan 1 suodattimet eivät ole riittävän luotettavia. Yrityksessä aloitettiin valmistajan 2 suodattimien edustajan kanssa yhteistyö suodatinongelman ratkaisemiseksi ja vaihdettiin valmistajan 2 suodattimet pysyvästi kontaminaatioselvityksen kohteena olleen fermenttorin prosessi-ilman sterilointiin. Kyseisen fermenttorin steriili-ilmalaitteisto poikkeaa, etenkin suodattimen steriloinnin osalta, muista tuotantolaitoksen fermenttoreista. Suodattimien vianetsinnässä huomioitiin niin paineilman laatu kuin ilmansuodattimien sterilointi- ja käyttöolosuhteet. Myöhemmin havaittiin ongelmia myös muiden fermenttorien prosessi-ilman steriilisuodattimissa, joten tehtiin päätös, että kaikki tuotantolaitoksen steriili-ilmansuodattimet vaihdetaan valmistajan 2 suodattimiin. Kontaminaatio-ongelmista päästiin toistaiseksi eroon, mutta yrityksessä päätettiin käynnistää eheydentestaukseen perustuva steriilisuodattimien käyttöikä tutkimus.

11 Steriilisuodattimien käyttöikä tutkimus

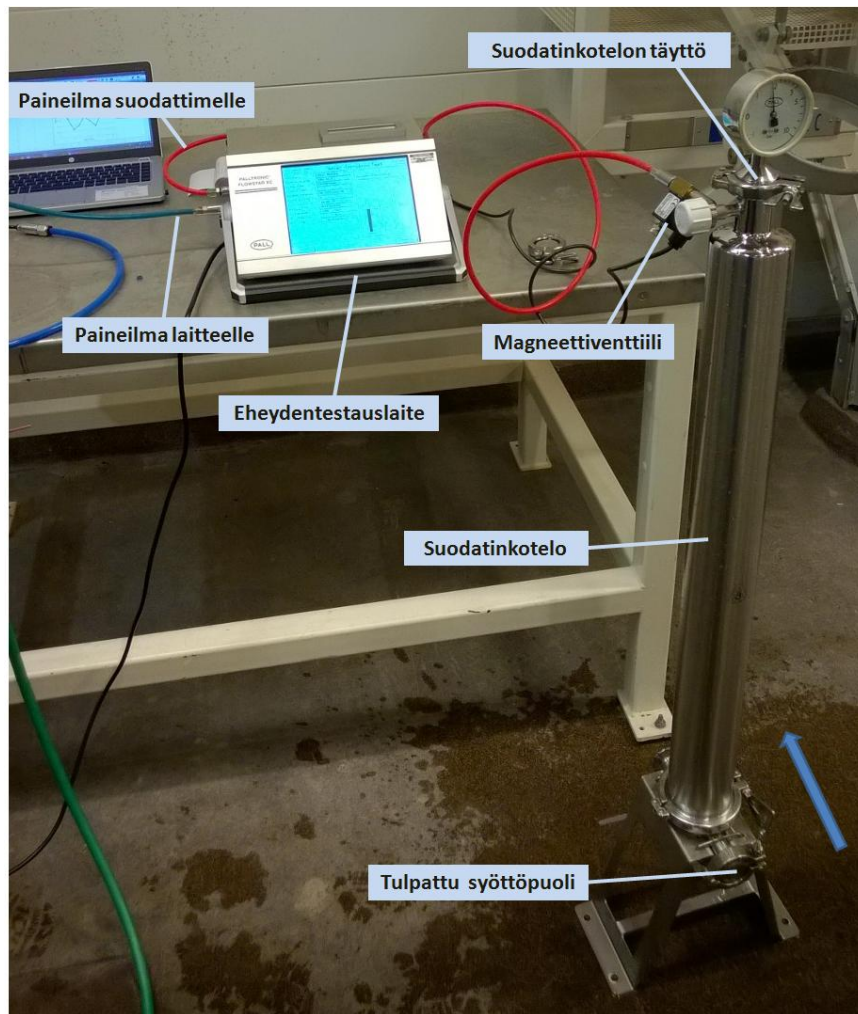
Käyttöikä tutkimuksen päätavoitteina on parantaa steriilisuodattimien luotettavuutta ja osoittaa kokeellisesti, että suodattimien vaihtoväli on määritelty tuotantolaitoksen käyttöolosuhteissa siten, että suodattimien toimintakyky säilyy koko käyttöjakson ajan. Lisäksi tutkimustulosten perusteella määritetään käyttöjakson sisälle säännöllinen seurantapiste. Suodatinvalmistajat antavat suodattimien käyttöiälle validointiohjelmien perusteella laboratorio-olosuhteissa määriteltyjä käyttöikä rajoituksia. Valmistajat kuitenkin painottavat, että suodattimien käyttöikä on aina määriteltävä erikseen käyttöolosuhteissa. Koska steriilisuodattimien käyttöikä on riippuvainen käyttöolosuhteista ja kestoian

ennustamiseen ei ole luotettavia menetelmiä, on ainoa vaihtoehto tutkia käytössä olevia suodattimia. Tämä vaikeuttaa tutkimusta, koska suodattimia ei voida tarkoituksellisesti tutkia vikaantumiseen asti. Tutkimuksessa päädyttiin keräämään toteutuneita käyttöikä tietoja ja arvioimaan eheydentestauksen virtaama-arvojen muutoksia. Aikaisempia tutkimuksia aiheesta ei ole juurikaan julkaistu, joten minkäänlaisia työssä hyödynnettäviä eheydentestaustuloksia ei ollut saatavilla.

11.1 Eheydentestauksen toteutus

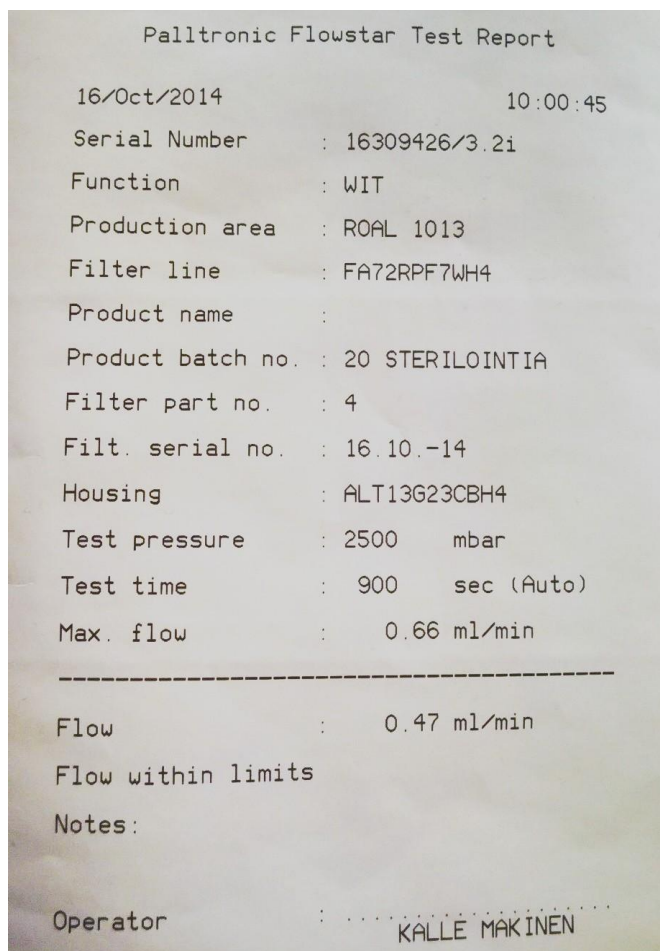
Steriili-ilmansuodattimien testaus toteutetaan tehtaan tuotantotiloissa. Testaukseen tarvitaan eheydentestauslaitteiston lisäksi ainoastaan paineilmaa ja vettä. Tehtaan paineilmaverkosta saadaan noin kuuden baarin paine, mikä on riittävä tulopaine eheydentestauslaitteelle. Testauksen valmistelu aloitetaan kiinnittämällä testattava suodatin patruuna testikotelon jalustaan ja kääntämällä patruunaa 90 astetta myötäpäivään, jolloin kiinnityssiivekkeet lukitsevat patruunaan. Kiinnityksen yhteydessä tarkistetaan suodattimen O-renkaiden kunto. Jokaiseen patruunaan merkitään ensimmäisellä testikerralla tunnus (liite 1). Suodatin patruunojen käsittelyssä on oltava varovainen, etteivät muoviosat halkea. Suodattimia on hyvä lisäksi säilyttää pystyssä, vaikka suodattimen ympärillä on muovinen suojarakenne.

Suodatin patruunan kiinnityksen jälkeen kotelon kupu asetetaan paikoilleen ja tulpataan syöttöpuolen liitos. Suodatinkotelo täytetään vedellä siten, että vesi peittää varmasti suodatin patruunan kokonaan. Jos suodatin ei ole kokonaan veden peittämä, testi epäonnistuu, koska syötettävä ilma virtaa vapaasti suodattimen läpi. Veden lämpötilan on oltava $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ja lämpötila tarkastetaan aina ennen täyttöä. On myös hyvä varmistaa, että testikotelon ja suodattimien lämpötila on tasaantunut huonelämpötilaan, jos ne ovat olleet käytössä tai niitä on varastoitu poikkeavassa lämpötilassa. Kun kotelo on täytetty vedellä, kiinnitetään suodatinkotelon päällä oleva painemittari, joka samalla sulkee kotelon. Ensimmäisen testin valmistelussa tarkistetaan kaikkien testilaitteiston tiivisteiden kunto, jotta vältetään testin epäonnistuminen. Suodatinkotelon yläosassa on ilmausventtiili, johon liitetään eheydentestauslaitteelta tuleva syöttöilma. Tässä yhteessä on myös eheydentestauslaitteen ohjaama magneettiventtiili. Kun eheydentestauslaitte käynnistetään, laite suorittaa ensimmäisenä itsetestauksen, jonka tarkoituksena on varmistaa, että laite on käyttökunnossa. Laite tulostaa itsetestausraportin, jonka jälkeen voidaan aloittaa suodattimien testaus. Kuvassa 12 nähdään testivalmis laitteisto.



Kuva 12. Eheydentestauslaitteisto valmiina testaukseen.

Alkuvalikosta valitaan menetelmäksi Water Intrusion Test. Valinnan jälkeen voidaan syöttää seuraavat tiedot: tuotantoalue, suodattimen malli, suodattimen tunnus, testikotelon malli, testipaine, suurin sallittu virtaama ja testaajan nimi. Tiedot tallentuvat laitteeseen, joten seuraavalla testikerralla tietoja ei tarvitse syöttää uudestaan. Testiaika valitaan automaattiseksi, jolloin testi keskeytyy itsestään, kun mitattava suure ei enää muutu. Kun tiedot on syötetty, voidaan käynnistää testiohjelma. Testiohjelman alussa on viiden minuutin stabilointiaika, jonka aikana suodattimen laskokset asettuvat vallitsevien olosuhteiden mukaisesti. Stabilointiajan jälkeen käynnistyy itse testi, joka kestää enimmillään 15 minuuttia. Testin etenemistä voidaan seurata laitteen piirtämästä kuvaajasta. Kun testi on valmis, laite poistaa suodatinkotelosta paineet avaamalla magneettiventtiilin ja tulostaa testiraportin (kuva 13).



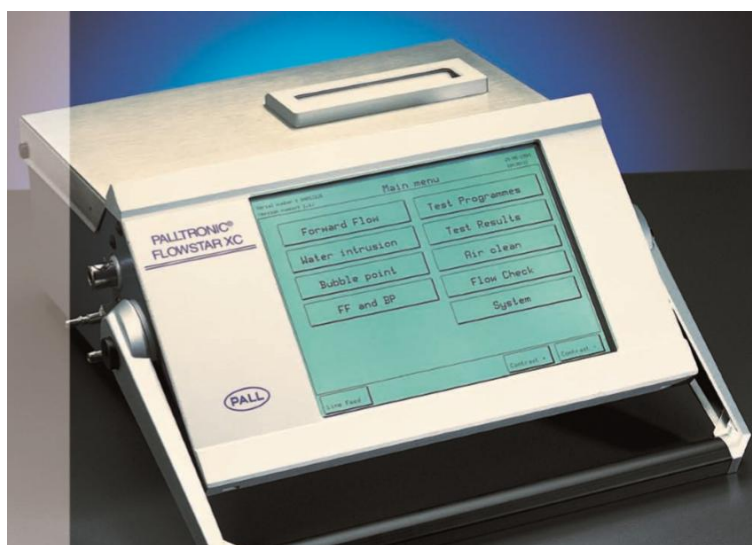
Kuva 13. Eheydentestauslaitteen tulostama testiraportti. Raportissa näkyy syötetyt tiedot ja mitattu virtaama-arvo, tässä testissä 0,47 ml/min.

Testin jälkeen suodatinkotelosta päästetään vedet pois avaamalla syöttöpuolen tulpattu liitos. Testikoteloon vaihdetaan seuraava testattava suodatinpatruuna ja testi valmistellaan edellä mainitulla tavalla. Laitteen tietoihin vaihdetaan ainoastaan testattavan suodattimen tunnus. Jokaisen suodattimen kohdalla on hyvä tarkastella myös visuaalisesti suodattimien kuntoa. Testin läpäisseiden suodattimien annetaan kuivua, minkä jälkeen ne voidaan asentaa takaisin käyttöön.

11.1.1 Eheydentestauslaite

Testeissä käytettävän automaattisen eheydentestauslaitteen malli on Palltronic Flowstar XC. Laitteen toiminta perustuu erittäin herkkään virtausmittaukseen. Laite mittaa vakioapaineen ylläpitämiseen tarvittavaa virtausta. Koska toiminta perustuu suoraan virtausmittaukseen paineenalenneman mittauksen sijaan, mittaus on huomattavasti tar-

kempi ja lämpötilavaihteluiden vaikutus tulokseen on pienempi. Laitteen käyttö on suunniteltu mahdollisimman yksinkertaiseksi ja laite soveltuu käyttöön teollisuusympäristössä. Laite sisältää Water Intrusion -testin lisäksi Forward Flow -testin, Bubble Point -testin ja näiden yhdistelmän. Laitteella voidaan myös testata vuotoja alle 200 litran järjestelmistä, esimerkiksi suodatinkoteloista tai pienistä fermentoreista. Water Intusion -testissä mittauksen resoluutio on 0,01 ml/min ja laitteen tarkkuus on $\pm 3 \%$ tai ± 0.02 ml/min. Water Intusion -testissä mittausalue on 0,05–50 ml/min. Epästabiileissa olosuhteissa laite antaa vikailmoituksen ja keskeyttää testin, mikä lisää testien luotettavuutta. Laite lähetetään valmistajalle kalibroitavaksi vuoden välein. [19, s. 3–15.]

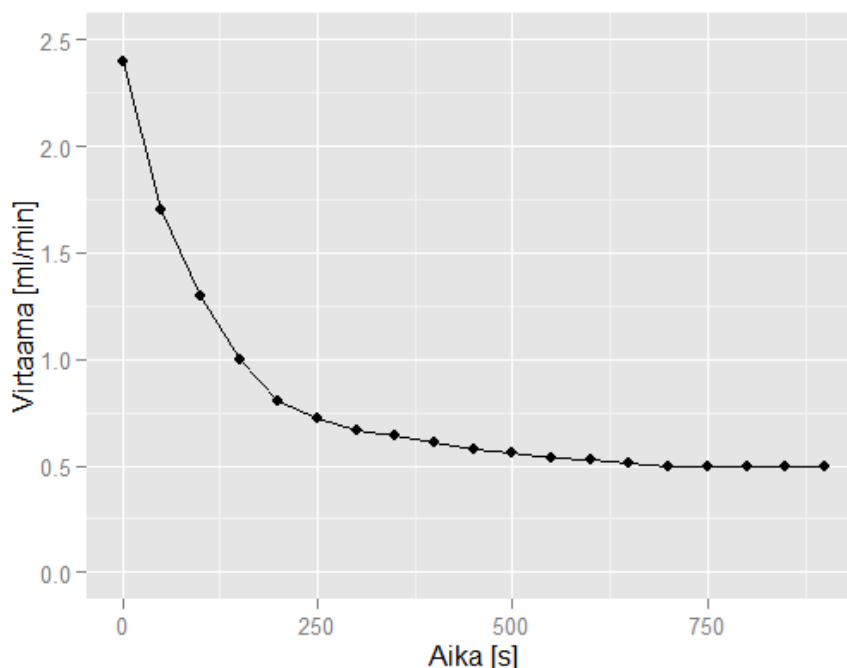


Kuva 14. Palltronic Flowstar XC -eheydentestauslaite. Laitteen käynnistyksen jälkeen kosketusnäytöltä valitaan testiohjelma [19, s. 1].

11.1.2 Water Intrusion Test

Water Intrusion Test (WIT) on vakiintunut menetelmä hydrofobisen steriilisuodattimien testaukseen. WIT mittaa suurentuneiden huokosten lisäksi hydrofobisuuden säilymistä suodattimessa. Testissä paineen vaikutuksesta vesi tunkeutuu hitaasti suodatinmatriisiin läpi. Vaurioituneilla suodattimilla veden tunkeutuminen on voimakkaampaa, joten testi antaa korkeampia virtaama-arvoja. Testiin vaikuttavat suodatinpinta-ala, paine, lämpötila ja veden sähköjohtavuus. Paineen, lämpötilan ja suodatinpinta-alan nostaminen antaa suurempia virtaama-arvoja, kun taas suurempi veden sähkönjohtavuus pienentää arvoja. Testissä vedenpinnan yläpuolelle jäävän kaasun paine laskee, kun kaasun tilavuus kasvaa membraanin läpäisseen veden vaikutuksesta. Tässä työssä käytettävällä eheydentestauslaiteella saadaan paineen ylläpitoon tarvittavan ilmavirtauk-

sen mittauksella määritettyä systeemistä poistuva virtaama. Koska laite toimii suoralla virtausmittauksella, nähdään virtaama koko testijakson ajalta (kuva 15). Määritettävä Water Intrusion -arvo saadaan, kun virtaama ei enää muutu.



Kuva 15. Esimerkki virtaaman muutoksesta testijakson aikana.

11.2 Eheydentestaussuunnitelman laatiminen

Suunnitelman laatimisessa hyödynnettiin yrityksen ensimmäisiä kokemuksia eheydentestauksesta, kun tämän työn aikana suoritettiin yhden vastakkaissuuntaan steriloitavan suodatinsarjan eheydentestaus ennen käyttöä sekä kolmen ja kuuden kuukauden käytön jälkeen. Tämä tutkimus tehdään tuotantolaitoksen virtaussuuntaan steriloitaville suodattimille. Käytössä olevien suodattimien testausta rajoittavat useat käytännön tekijät, jotka vaikuttivat merkittävästi suunnitelman laatimiseen. Suodattimien eheydentestaus olisi suositeltavaa suorittaa käyttöönotettaessa ja määräajoin käyttöolosuhteista riippuen. Tässä tutkimuksessa osa suodattimista on jo otettu käyttöön, joten kaikille suodattimille ei voida suorittaa eheydentestausta ennen käyttöönottoa.

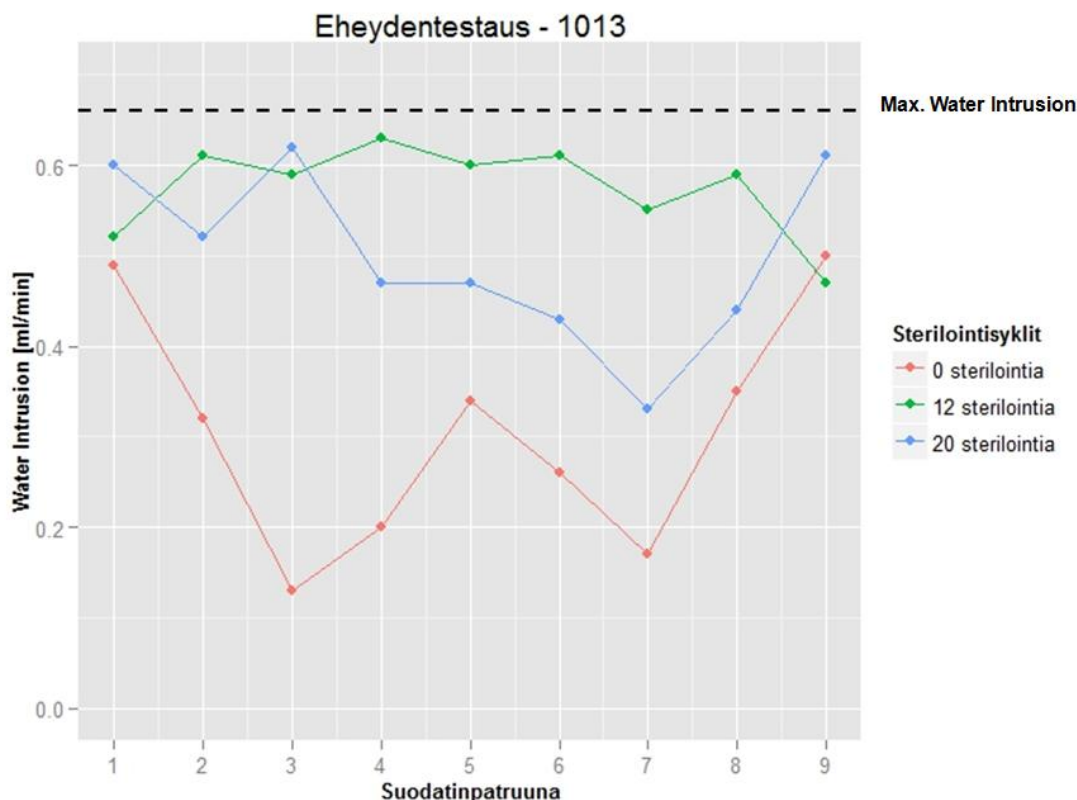
Suodattimien *in situ* -testaaminen ei myöskään ole mahdollista tuotantolaitoksella. Suodatinkotelot ovat kookkaita ja sisältävät 15 suodatinpatruunaa, joten yksittäisen suodattimen vaurioitumista ei havaittaisi, eikä suodatinkotelon täyttö vedellä olisi käy-

tännössä mahdollista. Suodatinpatruunojen testaaminen yksitellen on ainoa vaihtoehto, mutta sarjan testaaminen vie melko paljon aikaa. Kasvatusten välissä ei ole aina riittävästi aikaa suodattimien testaukseen, joten päädyttiin ottamaan käyttöön yksi ylimääräinen sarja, jolloin kasvatusten välissä ainoastaan vaihdetaan toinen suodatinsarja tilalle. Tutkimuksessa neljää suodatinsarjaa kierrätetään fermentoreissa 1113, 1114 ja 1213. Suodatinsarjojen kierrätyksen aikataulu nähdään taulukossa 1. Fermenttorien 1113 ja 1114 steriilisuodattimia palvelee sama esisuodatin ja steriilisuodatuksen laitteisto ja käyttöolosuhteet ovat hyvin samanlaiset. Fermenttorilla 1213 on oma esisuodatin, mutta käyttöolosuhteet ovat muuten samankaltaiset. Suodattimien kierrätyksellä voidaan valita joustavasti sopivat testauspäivät riippumatta tuotantoaikataulusta.

Taulukko 1. Suodatinsarjojen A, B, C ja D kierrätysaikataulu fermentoreissa 1113, 1114 ja 1213.

	2014						2015										
	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1113	A	A	A	A	A	A	D	D	D	D	D	D	B	B	B		
1114		B	B	B	B	B	B	A	A	A	C	C	C	D	D	D	
1213			C	C	C	C	C	C	B	B	B	A	A	A	C	C	C
Test.							A	B	C		A	B	D	C			D

Suodatinvalmistajan mukaan steriilisuodattimet kestävät jopa 165 sterilointisykliä, kun suodattimet steriloidaan suodatussuuntaan. Suodattimien käyttöikä on valmistajan mukaan 12 kuukautta 60 °C:ssa. Tämä tarkoittaa sitä, että tuotantolaitoksella käyttöikä täytyisi ennen sterilointisykliä määrää. Valmistajan antamat arvot ovat laboratoriotesteissä määritettyjä arvoja, eikä valmistaja ilmoita yksityiskohtaisia arvoja erilaisissa käyttöolosuhteissa. Etenkin toistuvat steriloinnit lyhentävät huomattavasti suodattimien käyttöikää. Eheydentestauskokemusten ja käyttöolosuhteiden perusteella arvioitiin, että sopiva varmuuskerroin on 2, joten suodatinsarjat testataan ensimmäisen kerran kuuden kuukauden käytön jälkeen. Kuvassa 16 nähdään yhden suodatinsarjan eheydentestauks tulokset, jossa 20 sterilointia vastaa noin kuuden kuukauden käyttöikä tuotantolaitoksella. Tämän suodatinsarjan testauksessa tehtiin havainto, että verrattuna kolmen kuukauden käyttöön, kuuden kuukauden käytön jälkeen suodattimiin oli kertynyt likaa ja ne eivät olleet enää puhtaan valkoisia. Water Intrusion -arvot olivat kuitenkin alle maksimiarvon.



Kuva 16. Fermenttorin 1013 ilmansuodattimien eheydentestauksen tulokset.

Kuuden kuukauden testien jälkeen suodatinsarjat testataan 9 kuukauden käytön jälkeen, jolloin saadaan seurantatulokset kahdelle käyttöikäarvolle. Suodattimet vaihdetaan uusiin viimeistään 12 kuukauden jälkeen, mutta käytöstä poistettuja suodattimia ei lähtökohtaisesti enää testata. Käytöstä poistettujen suodattimien testauksella saataisiin kyllä lisää tutkimusdataa, mutta testaus vie niin paljon aikaa, eikä testauksesta ole enää hyötyä kontaminaatioiden estämisessä, joten niiden testausta katsotaan tilanteen mukaan. Tulokset kirjataan liitteessä 1 esitettyyn tulostaulukkoon, johon merkitään myös sterilointisykliä määrä ja kumulatiivinen suodatusaika, joka voidaan määrittää prosessihistoriadatasta.

11.3 Tulosten käsittely

Päätavoite jokaisessa eheydentestauksessa on varmistaa, että suodattimet eivät ole vaurioituneet käytössä. Kuitenkin eri-ikäisten suodattimien eheydentestatuloksista halutaan tutkia myös mahdollisia virtaama-arvojen muutoksia. Eheydentestatuloksista

ta tarkastellaan, onko mittaustulosten perusteella steriilisuodattimien toimintakyvyssä tapahtunut muutoksia ennen tavoitekäyttöään saavuttamista. Tutkimuksessa havaintojen määrä on kohtalaisen suuri (60 testattavaa suodatinpatruunaa per käyttöikä) ja oletuksena on, että mittaustulokset ryhmissä ovat likimain normaalijakautuneita. Normaali-jakaumaoletus voidaan osoittaa ns. normaalitodennäköisyyskuvalla ja Shapiro Wilk -normaalisuutestillä. Mittaustulokset ovat toisistaan riippuvia, joten ryhmien välisten erojen tulkintaan käytetään kahden riippuvan otoksen t-testiä, joka on keskiarvoihin perustuva menetelmä. Käytännössä halutaan tietää, onko tilastollisesti merkitsevää eroa suodattimien eheydentestauksen virtaama-arvoissa, kun käyttöikä on 6 tai 9 kuukautta. Suodattimien vaihtovälin määrittämisessä ja luotettavuuden osoittamisessa kiinnostavinta on kuitenkin vikaantuneiden suodattimien määrä. Eheydentestaustuloksista vikaantuneiden suodattimien määrittäminen on yksinkertaista. Jos virtaama ylittää valmistajan ilmoittaman maksimiarvon, suodattimen toimintakyky ei ole vaatimusten mukainen. Tutkimuksessa kirjataan vikaantuneiden suodattimien määrä aikaväleillä 0–6 kk ja 6–9 kk. Tutkimuksen aikana vikaantuneiden suodattimien määrä toimii lähtötietona vikaantumistilaston keräämiselle. Jos kaikki tutkimuksen suodatinpatruunat ovat toimintakykyisiä viimeisten testien jälkeen ja virtaama-arvoissa ei havaita systemaattista kasvua, voidaan jo melko hyvällä todennäköisyydellä osoittaa, että tuotantolaitoksen käyttöolosuhteissa 12 kuukauden vaihtoväli on riittävä.

12 Yhteenveto

Työssä käytiin läpi teollisen fermentointiprosessin kontaminaatoriskejä ja todettiin, että kontaminaation aiheuttaja on useimmiten mekaaninen vika laitteistossa, mikä johtaa tiiviyn menettämiseen tai steriloinnin epäonnistumiseen. Lisäksi kontaminaatioita aiheuttavat muun muassa toiminnalliset virheet. Vaikka kontaminaatioita ei voida täysin välttää, toimintatapojen kehittämisellä niiden määrää voidaan vähentää huomattavasti. Laitevikojen aiheuttamien kontaminaatioiden ehkäisemiseksi todettiin muutamia hyödyllisiä tapoja: kunnossapitosuunnitelmien kehittäminen, laitteistotarkastusten lisääminen ja käyttöolosuhteiden hallinta. Työn aikana nähtiin myös kontaminaatiolähteen tutkimisen haasteet ja kontaminaatioselvityksen vaikutukset yrityksen toimintaan. Kontaminaatiolähteen tutkimisessa kontaminanttien tunnistaminen, poikkeavien tapahtumien läpikäyminen ja laitteiston tarkastus ovat menetelmiä, joilla päästään usein kontaminaatiolähteen jäljille. Kun kontaminaatiotutkimus voidaan kohdistaa tietylle alueelle, on käytettävissä erilaisia menetelmiä kontaminaatiolähteen todentamiseksi. Tutkimus-

kohteesta riippuen menetelmä voi olla esimerkiksi mikrobiviljelynäytteiden ottaminen, tiiviyn testaus tai sellaisen steriiliystestin suorittaminen, jolla tutkitaan vain tiettyä kohdetta. Lisäksi työssä todettiin, että kontaminaatioselvityksiin on varauduttava selkeillä kirjallisilla suunnitelmilla, jotka sisältävät tarkastuslomakkeet ja menettelyohjeet yleisimmille tutkimusmenetelmille ja korjaustoimenpiteille. Ratkenneen kontaminaatioselvityksen jälkeen on pohdittava toimenpiteitä, joilla vastaavat kontaminaatiotapaukset estetään tulevaisuudessa.

Kontaminaatioselvityksessä ilmenneen ongelman seurauksena työssä tutustuttiin fermentoreihin syötettävän prosessi-ilman steriilisuodattimien eheydentestaukseen ja laadittiin testaussuunnitelma steriilisuodattimien käyttöikä tutkimukselle. Eheydentestaukseen käytetään automatisoitua eheydentestauslaitetta ja hydrofobisille steriilisuodattimille vakiintunutta Water Intrusion Test -menetelmää. Eheydentestaus todettiin yksinkertaiseksi ja luotettavaksi menetelmäksi, jolla voidaan havaita vaurioitunut steriilisuodatin. Toistaiseksi on vielä kuitenkin epäselvää, voidaanko virtaama-arvoista havaita vielä toimintakykyisessä suodattimessa tapahtuneita muutoksia. Testaussuunnitelman laatimiseen vaikuttivat merkittävästi käytännön mahdollisuudet testausten toteuttamiselle. Käyttöä arvioimisen lisäksi tuloksista määritetään sopiva säännöllinen tarkastuspiste steriilisuodattimien käyttöjakson sisälle. Ennen kaikkea tutkimuksella saadaan arvokasta tietoa steriilisuodattimien käyttäjästä tuotantolaitoksen käyttöolosuhteisessa ja lisätään steriilisuodattimien luotettavuutta. Steriilisuodattimien luotettavuuden lisääminen on yksi askel kohti parempaa kontaminaatoriskien hallintaa.

Lähteet

- 1 Reddy, S.M., Reddy, R.S., Babu, G.N. 2012. Basic Industrial Biotechnology. Daryaganj: New Age International.
- 2 Raj, A.E., Karanth, N.G. Fermentation Biotechnology and Bioreactor Design. Teoksessa Pometto, A., Shetty, K., Paliyath, G., Levin R.E. 2006, Food Biotechnology. Second Edition. Boca Raton: CRC Press.
- 3 Marvin, C., Wilson, J. Fermenter/Bioreactor Design. Teoksessa Flickinger, Michael C. 2013. Upstream Industrial Biotechnology. Somerset: Wiley.
- 4 Junker B. ym. 2006. Sustainable Reduction of Bioreactor Contamination in an Industrial Fermentation Pilot Plant. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 102, s. 251–268.
- 5 McDonnel, Gerard E. 2007. Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance. Washington: ASM Press.
- 6 Yusuf, C., Murray, M. 1994. Clean-in-place systems for industrial bioreactors: design, validation and operation. Journal of Industrial Microbiology. Vol. 13, s. 201–207.
- 7 Dorane, Pauline M. 1995. Bioprocess Engineering Principles. London: Academic Press.
- 8 Dutta, Rajiv. 2008. Fundamentals of Biochemical Engineering. New Delhi: Ane Books India.
- 9 Gray, David R. Bioreactor Operations. Teoksessa Flickinger, Michael C. 2013. Upstream Industrial Biotechnology. Somerset: Wiley.
- 10 Feeherry, F., Munsey, D., Rowley, D. 1987. Thermal Inactivation and Injury of *Bacillus stearothermophilus* Spores. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 53, s. 365–370.
- 11 Meltzer, Theodore H. 2006. Modus of Filtration. Advances in Biochemical Engineering. Vol. 98, s. 27–71.
- 12 Hutten, Irwin M. 2007. Handbook of Non-Woven Filter Media. Oxford: Elsevier.
- 13 Product Support – Steam in Place. 2002. Esite. Durham: Domnick Hunter Ltd.

- 14 Hines, M., Holmes, C., Schad, R. Simple Strategies to Improve Bioprocess Pure Culture Processing. 2010. Pharmaceutical Engineering. Vol. 30, s. 1–10.
- 15 Holloway, M., Nwaoha, C., Onyewuenyi, O. 2012. Process Plant Equipment: Operation, Control, and Reliability. Somerset: Wiley.
- 16 High Quality Compressed Air – A Guide to the ISO 8573 Series Compressed Air Quality Standard. 2007. Esite. Gateshead: Parker Hannifin Ltd.
- 17 Colly Uutiset. 2003. Esite. Helsinki: Colly Company Oy.
- 18 Jornitz, Mike W. 2006. Integrity Testing. Advances in Biochemical Engineering. Vol. 98, s. 143–180.
- 19 Palltronic Flowstar XC Integrity Test Instrument. 2008. Esite. Portsmouth: Pall Corporation.
- 20 Jaenchen R., Schubert, J., Jafari, S., West, A. 1997 Application Note: Studies on the Theoretical Basis of the Water Intrusion Test (WIT). Journal of Parenteral Sciences. Vol. 2, No. 2, s. 39–45.

Steriilisuodattimien eheydentestaus				
A-sarja				
Päivämäärä				
Käyttöikä	n. 6 kk		n. 9 kk	
Kum. suodatusaika [vrk]				
Sterilointien määrä				
Mistä fermenttorista?	1113 ▼		1114 ▼	
Tunnus	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu
A1		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A2		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A3		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A4		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A5		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A6		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A7		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A8		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A9		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A10		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A11		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A12		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A13		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A14		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
A15		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B-sarja				
Päivämäärä				
Käyttöikä	n. 6 kk		n. 9 kk	
Kum. suodatusaika [vrk]				
Sterilointien määrä				
Mistä fermenttorista?	1114 ▼		1213 ▼	
Tunnus	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu
B1		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B2		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B3		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B4		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B5		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B6		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B7		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B8		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B9		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B10		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B11		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B12		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B13		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B14		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
B15		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

C-sarja				
Päivämäärä				
Käyttöikä	n. 6 kk		n. 9 kk	
Kum. suodatusaika [vrk]				
Sterilointien määrä				
Mistä fermenttorista?	1213 ▼		1114 ▼	
Tunnus	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu
C1		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C2		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C3		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C4		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C5		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C6		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C7		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C8		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C9		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C10		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C11		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C12		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C13		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C14		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
C15		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

D-sarja				
Päivämäärä				
Käyttöikä	n. 6 kk		n. 9 kk	
Kum. suodatusaika [vrk]				
Sterilointien määrä				
Mistä fermenttorista?	1113 ▼		1114 ▼	
Tunnus	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu	Water Intrusion [ml/min]	Vaihdettu
D1		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D2		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D3		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D4		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D5		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D6		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D7		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D8		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D9		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D10		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D11		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D12		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D13		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D14		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
D15		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>



Lomake
Sterilisuodattimien eheydentestaus

22.9.2014

1 (1)

Eheydentestauslomake – Water Intrusion Test

Päivämäärä: _____
 Fermenttori: _____
 Suodattimien malli: _____
 Testin suorittaja: _____

Patruuna	Water Intrusion [ml/min]
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	

Max. Water Intrusion [ml/min]	
Lämpötila [°C]	
Testipaine [mbar]	